Standar Nasional Indonesia

SNI 01-2335-1991

Penentuan salmonella

ICS 67.120.30

Badan Standardisasi Nasional BSN

Daftar isi

Penentuan salmonella

0 Pendahuluan

Isolasi Salmonella dari berbagai macam kananan sering memerlukan metode yang berbeda dari metode yang digunakan untuk pemeriksaan klinis dan kesehatan masyarakat. Merupakan hal yang tidak mungkin untuk meny.rankan satu metode saja yang dapat secara memuaskan diterapkan untuk semua makanan dan serotype. Semua metode memiliki prinsip yang hampir sarha dan terdiri dari langkah-langkah prosedur pra-pengkayaan, pengkayaan penanaman pada agar selektif dan taksonomi penentuan koloni tersangka. Kompleksitas dari prosedur disebabkan oleh Salmonella umumnya didistribusi, baik secara langsung maupun tidak langsung, melalui kontaminasi feces.

Metode di bawah ini sangat sesuai untuk pertumbuhan Salmonella sementara menghalangi pertumbuhan mikroorganisma lain yang bersifat kompetitif. Pada umumnya pra-pengkayaan merangsang pertumbuhan Salmonella dari keadaan tidak aktif secara fisiologis atau adanya trauma, di mana diperkirakan Salmonella ada dalam makanan yang telah mengalami proses pemanasan, pengawetan, pembekuan, penekanan dengan daya osmotik yang tinggi, dan perubahan pH. Media yang digunakan untuk pengkayaan tidak selektif tidak mengandung bahan kimia yang secara disengaja ditambahkan untuk menghalangi pertumbuhan Salmonella. Merupakan hal yang sangat penting untuk menyesuaikan pH sehingga akan diperoleh hasil yang memuaskan. Media pengkayaan sebenarnya mengandung zat-zat kimia yang menghalangi pertumbuhan yang ditujukan untuk bakteri coliform dan mikoorganisma lain selain Salmonella.

Pada umumnya semua bahan makanan yang telah mengalami perlakuan pengeringan (dehidrasi, atau dibuat bubuk) harus mengalami perlakuan pra-pengkayaan dengan media yang hang a merangsang pertumbuhan Salmonella. Makanan tersebut biasanya telah mengandung lebih sedikit mikroorganisma, sehingga Salmonella yang ada memiliki sedikit kemungkinan mengalami kompetisi dengan mikroorganisma lain. Makanan mentah dan makanan jadi yang telah mengalami kontaminasi yang sangat bear setelah diproses, harus melalui langkah pengkayaan langsung untuk mencegah pertumbuhan mikroorganisma lain.

Antiserum somatic (0) dan polyvalent flagellar (H) tidak mengandung antibodi yang diperlukan untuk bereaksi dengan seluruh jenis Salmonella (lebih dari 1.400 jenis), sekarang telah diterima dalam skema Kauftman-White. Hasil serologi negatif akan dijumpai pada Salmonella apabila diuji dengan antisera tersebut. Identifikasi dari kultur tersebut harus dilakukan melalui pengujian biokimia dan analisa serologi yang lebih lanjut.

1 Peralatan

1.1 Blender dengan wadah steril.
1.2 Botol bertutup bermulut lebar atau peralatan sejenisnya yang steril.
1.3 Gelas preparat.
1.4 Timbangan.
1.5 Inkubator 351.- 1°C.
1.6 Water bath 50°C.
1.7 Petridish.
1.8 Pipet steril.
1.9 Jarum inokulasi dengan diameter bagian dalamnya 3 mm.
1.10 Spatula.
1.11 Sterile bent glass spreader rods.

2 Media Dan Reagensia

2.1 Lactose broth.
2.2 NaOH 1 N.
2.3 Tergito anionic.
2.4 Steril triton X-100.
2.5 Selenite cystine broth (SCB).
2.6 Brilliant green agar (BGA).
2.7 Tetrathyonate broth.
2.8 Salmonella-shigella agar (SS-agar).
2.9 Bismuth sulfite agar (BSA).
2.10 Triple sugar iron agar (TSI-agar).
2.11 Tryptophane (tryptone) broth.
2.12 Trypticase (tryptic) soy broth.
2.13 Lauryl sulfate tryptose broth.
2.14 Trypticase soy tryptose broth.
2.15 Buffered glucose broth (MR-VP medium).
2.16 Simons citrate agar.
2.17 Urea broth.
2.18 Rapid urea broth.
2.19 Malonate broth.
2.20 Lysine iron agar (LIA).
2.21 Lysine decarboxylase broth.
2.22 Media Tes Pergerakan (motility) atau media semi solid.
2.23 KCN broth (Potassium cyanide).
2.24 Phenol red Carbohydrate broth - Dulcitol, lactose, succrose.
2.25 Pruple carbohydrate broth - dulcitol, lactose, succrose.
2.26 McConkey agar.

2.27 Nutrient broth.
2.28 Kovac's Reagensia untuk tes indolen.
2.29 Voges - Proskauer (VP) Reagensia tes.
2.30 KOH 1 N (Potassium hydroxide).
2.31 Hydrochloric acid 1 N.
2.32 Larutan brilliant green dye 1%.
2.33 Larutan crystal violet 1%.
2.34 Indikator methyl red.
2.35 Kertas pH (simpangan 6¯8), dengan penyimpangan maksimum 0,4 pH setiap perubahan warna.
2.36 Salmonella polivalent somatic 0 dan flagellar H Antiserum.
2.37 Larutan physiological saline steril.
2.38 Larutan Formalized physiological saline.
2.39 Tergitol Antonie 7.
2.40 Triton X-100.
2.41 Brilliant Heart Infusion Broth (BHI).

3 Metode-metode penyiapan berbagai bahan makanan untuk isolasi salmonella

Berapapun jumlah keseluruhan contoh yang diambil, jumlah contoh yang akan digunakan harus terdiri tidak lebih dari lima belas (15),25 g unit analisa (375 g). Jumlah contoh tersebut kemudian ditambahkan dan dicampur secara aseptis dengan laktose broth dalam jumlah yang cukup sampai mendapatkan pengenceran 1 : 10. Analisa dari contoh tersebut ditentukan berdasarkan dari petunjuk yang terdapat pada standar "Penganan contoh" di bawah judul "Analisa contoh". Standar tersebut memberikan petunjuk tentang analisa Salmonella dalam bahan makanan. Petunjuk di bawah ditujukan untuk menangani 25 g sub-contoh dan petugas analisa harus menggunakan kelipatan dari jumlah ini untuk memenuhi persyaratan Penanganan Contoh.

3.1 Prosedur untuk telur utuh yang dikeringkan, kuning telur yang dikeringkan, putih telur yang dikeringkan, telur beku atau cairan yang di pasteurisasi, campuran tepung (cake, kue-kue donat, biskuit dan roti), dan makanan-makanan bayi.

3.1.1 Apabila makanan berbentuk beku, lelehkan porsi yang sesuai secepat mungkin untuk menghindari berkembang biaknya mikoroorganisma yang ada atau rusak/matinya Salmonella (tidak lebih dari 45°C selama lebih dari 15 menit atau semalam pada suhu 5¯10°C).
3.1.2 Secara Aseptis timbang 25 g contoh ke dalam wadah bertutup yang steril.
3.1.3 Tambahkan 225 ml lactose broth steril. Apabila produk terbentuk tepung (misalnya, telur utuh yang dikeringkan), tambahkan 15 ml lactose broth steril dan blender sampai menjadi larutan yang halus dan homogen. Tambahkan 3 porsi lactose broth (misalnya, 10, 10 dan 190 ml) sampai mencapai volume total 225 ml. Blender lagi sampai rata.

3.1.4 Tutup wadah dan biarkan pada suhu ruang selama 60 menit.

3.1.5 Campur dengan mengocok, dan tentukan pH nya dengan kertas pH.

3.1.6 Apabila perlu, sesuaikan pHnya sampai 6,8 ± 0,2 dengan NaOH 1 N atau HC1 1 N, steril. Tutup, dan kocok hingga homogen sebelum menentukan pHnya lagi.

3.1.7 Kendurkan tutupnya sekitar 1/4 nya, dan inkubasi pada suhu 35°C selama 24 ± 2 jam.

3.1.8 Teruskan seperti pada bagian 4.1 - 4.14.

3.2 Prosedur untuk susu bubuk tanpa lemak dan susu bubuk berlemak.

3.2.1 Secara aseptis timbang 25 g contoh ke dalam wadah steril.

3.2.2 Tambahkan 250 ml aquadest steril dan aduk hingga homogen.

3.2.3 Tentukan pHnya dengan kertas pH. Apabila pHnya < 6,6 tarnbahkan NaOH 1 N steril sampai mendapat pH 6,8 ± 0,2.

3.2.4 Tambahkan 0,5 ml larutan brilliant green 1% dan aduk hingga homogen.

3.2.5 Inkubasi pada suhu 35°C selama 24 ± 2 jam. 3.2.6 Teruskan seperti bagian 4.1 - 4.14.

3.3 Prosedur untuk produk-produk telur beku dan produk-produk tanpa pasteurisasi.

3.3.1 Secara aseptis, timbang 25 g produk sebanyak 2 kali (duplo) dan masukkan dalam wadah bertutup yang steril.

3.3.2 Tambahkan 225 ml selenite cystine broth ke dalam salah satu wadah, dan 225 ml tetrathionate broth ke dalam wadah lainnya.

3.3.3 Apabila pH < 6,6 tambahkan NaOH 1 N steril untuk mencapai pH 6,8 ± 0,2.

3.3.4 Kocok hingga homogen, dan buka tutupnya 1/4.

3.3.5 Inkubasi pada suhu 35°C selama 24 ± 2 jam.

3.3.6 Teruskan seperti bagian 4.1 - 4.14.

3.4 Prosedur untuk makanan yang mengandung telur (mie, egg rools dan lain-lainnya).

3.4.1 Secara aseptis timbang 25 g contoh ke dalam wadah blender steril.

3.4.2 Tambahkan 225 ml lactose broth steril dan blender selama 2 menit pada kecepatan 8.000 rpm.

3.4.3 Secara aseptis pindahkan ke dalam wadah bertutup steril dan kocok hingga homogen.

3.4.4 Apabila pH < 6,6 tambahkan NaOH 1 N steril sampai mencapai pH 6,8 ± 0,2.

3.4.5 Kendurkan tutup 1/4 nya dan inkubasi selama 24 ± 2 jam pada suhu 35°C. 3.4.6 Teruskan seperti bagian 4.1 - 4.14.

3.5 Prosedur untuk kelapa

3.5.1 Secara aseptis timbang 25 g contoh ke dalam wadah bertutup steril.
3.5.2 Tambahkan 225 ml lactose broth steril dan kocok hingga homogen.
3.5.3 Sesuaikan pHnya sampai 6,8 ± 0,2 dengan menambahkan NaOH 1 N atau HC1 1 N steril.
3.5.4 Tambahkan sampai 2,2 ml Tergitol Anionic 7 yang telah dikukus selama 15 menit dan aduk hingga homogen.
Triton X—100 steril dapat digunakan sebagai pengganti bahan pembaur. Gunakan triton X—100 untuk membentuk busa (gunakan sedikit mungkin, 2—3 tetes).
3.5.5 Kendurkan tutup jar 1/4 nya, dan inkubasi pada suhu 35°C selama 24 ± 2 jam.
3.5.6 Teruskan seperti bagian 4.1 — 4.14.

3.6 Prosedur untuk zat-zat pewarna

3.6.1 Untuk produk-produk dengan pH 6,0 atau lebih (dalam bentuk larutan 10%), gunakan metode yang sama seperti pada telur utuh yang dikeringkan.
3.6.2 Untuk zat pewarna di bawah pH 6,0 :

1). Secara aseptis timbang 25 g contoh ke dalam wadah bertutup steril.
2). Tambahkan 225 ml brilliant green tetrathyonate broth dan aduk hingga homogen.
3). Kendurkan tutup 1/4 nya, dan inkubasi selama 24 ± 2 jam pada suhu 35°C.
4). Teruskan seperti bagian 4.3 — 4.14.

3.7 Prosedur untuk ragi kering (tidak aktif)

3.7.1 Secara aseptis timbang 25 g contoh ke dalam wadah bertutup steril.
3.7.2 Tambahkan (100 ml Aquadest Steril), dan aduk hingga homogen.
3.7.3 Apabila pH < 6,6 sesuaikan dengan NaOH 1 N steril hingga 6,8 ± 0,2.
3.7.4 Kendurkan tutup 1/4 nya, dan inkubasi pada suhu 35°C selama 24 ± 2 jam.
3.7.5 Teruskan seperti bagian 4.3 — 4.14.

3.8 Prosedur untuk ragi kering (aktif)

3.8.1 Secara aseptis timbang 25 g contoh ke dalam wadah bertutup steril.
3.8.2 Tambahkan 225 ml trypticase (trypic) soy broth steril, dan aduk hingga homogen.
3.8.3 Apabila pH < 6,6 sesuaikan dengan menambahkan NaOH 1 N atau HCL 1 N steril sampai 6,8 ± 0,2. Tutup, dan aduk hingga homogen sebelum ditentukan pH nya lagi. Apabila pH ditentukan sebelum ragi benar tercampur hingga homogen, pH akhir akan kurang dari yang diinginkan.
3.8.4 Inkubasi campuran ragi - broth pada suhu 35°C selama 24 ± 2 jam. Kendurkan tutup wadah 1/4 nya sebelum inkubasi.

3.8.5 Kocok campuran tersebut sebelum diambil 1,0 ml untuk dipindahkan ke dalam 10,0 ml lauryl sulfat triptose broth, dan 1,0 ml ke dalam 10,0 tetrathyonate broth.
3.8.6 Inkubasi pada suhu 35°C selama 24 ± 2 jam.
3.8.7 Teruskan seperti pada bagian 4.3 - 4.14, dengan melakukan goresan dari tiaptiap broth selektif di atas tersebut dengan jarum inokulasi berdiameter 3 mm, masing-masing ke dalarn 3 agar isolasi selektif, bagian 4.3.

3.9 Prosedur untuk daging, bahan makanan hewani, produk-produk glandular dari tepung ikan.

3.9.1 Produk kering, produk yang telah diproses dan produk yang telah mengalami pemanasan :

1). Timbang secara aseptis 25 g bahan dan masukkan ke dalam wadah blender steril.
2). Tambahkan 225 ml lactose broth steril dan hancurkan dengan menggunakan blender selama 2 menit dengan kecepatan 8.000 rpm.
3). Pindahkan secara aseptis ke dalam botol steril yang bermulut besar dan bertutup (bila produk berbentuk tepung atau berbentuk potongan-potongan kecil, maka penghancuran dengan menggunakan blender dapat ditiadakan).
4). Bila pH di bawah 6,6 sesuaikan sampai menjadi 6,8 ± 0,2 dengan menambahkan NaOH 1 N steril.
5). Apabila bahan tersebut mengandung lemak dalam kadar yang tinggi, maka tambahkan 2,2 ml tergitol anionic yang telah dikukus selama 15 menit.
6). Inkubasi pada suhu 35°C selama 24 ± 2 jam.
7). Selanjutnya ikuti bagian 4.1 — 4.14.

3.9.2 Produk mentah dan produk yang banyak terkontaminasi :

1). Secara aseptis timbang 2 kali 25 g bahan dan masukkan masing-masing ke dalam wadah blender steril yang berbeda-beda.
2). Tambahkan 225 ml SCB ke dalam salah satu wadah dan 225 ml tetrathyonate broth ke dalam wadah lainnya untuk kemudian dihancurkan dengan blender selama 2 menit.
3). Pindahkan secara aseptis ke dalam botol steril yang bermulut besar dan bertutup dengan kapasitas 500 ml (bila produk berbentuk tepung atau potongan-potongan kecil, maka penghancuran dengan menggunakan blender dapat ditiadakan).
4). Inkubasi pada suhu 35°C selama 24 ± 2 jam.
5). Selanjutnya ikuti bagian 4.3 — 4.14.

3.10 Prosedur untuk paha kodok (domestik dan impor) dan yang mengalami khlorinasi.

3.10.1 Secara aseptis timbang 25 g bahan dan masukkan ke dalam botol bermulut lebar dan bertutup dengan kapasitas 500 ml yang mengandung 225 ml lactose broth steril.
3.10.2 Hancurkan dengan men[g]gunakan blender selama 2 menit.

3.10.3 Inkubasi pada suhu 35.9 C selama 24 ± 2 jam.
3.10.4 Selanjutnya ikuti bagian 4.3 — 4.14.

3.11 Prosedur untuk permen atau bahan lain yang dilapisi permen.

3.11.1 Secara aseptis timbang 25 g ke dalam wadah blender steril.
3.11.2 Tambahkan kira-kira 75 ml dari 250 ml larutan susu bubuk tanpa lemak (campuran 100 g susu bubuk tanpa lemak dengan 1.000 ml aquadest steril).
3.11.3 Blender selama 2 menit, dan pindahkan ke dalam sisi larutan susu tersebut (sekitar 175 ml).
3.11.4 Apabila pH < 6,6 sesuaikan dengan menambahkan NaOH 1 N steril sampai 6,8 ± 0,2.
3.11.5 Tambahkan 4 ml larutan crystal violet 1% atau 2 ml larutan brilliant green 1%, aduk hingga homogen. Gunakan salah satu saja.
3.11.6 Inkubasi pada suhu 35°C selama 24 ± 2 jam.
3.11.7 Teruskan seperti bagian 4.1 — 4.14.

3.12 Prosedur untuk produk-produk campuran beku dengan gula dalam jumlah yang banyak.

3.12.1 Secara aseptis timbang 25 g contoh ke dalam wadah bertutup steril.
3.12.2 Tambahkan 225 ml nutrient broth.
3.12.3 Apabila pH < 6,6, sesuaikan sampai 6,8 ± 0,2 dengan menambahkan Na011 1 N steril.
3.12.4 Kendurkan tutup 1/4 nya dan inkubasi selama 24 ± 2 jam pada suhu 35°C.
3.12.5 Teruskan seperti bagian 4.1 — 4.14.

4 Isolasi salmonella

4.1 Kocok botol perlahan-lahan kemudian ambil 1 ml dan pindahkan ke dalam 10 ml SC serta ambil 1 ml lagi dan pindahkan ke dalam tetrathyonate broth sebanyak 10 ml.

4.2 Inkubasi selama 24 * 2 jam pada suhu 35°C.

4.3 Ambil dengan menggunakan jarum inokulasi berdiameter 3 mm dan goreskan pada BGA, SS agar dan BSA.

4.4 Lakukan juga pada tetrathyonate broth.

4.5 Inkubasikan pada suhu 35°C selama 24 ± 2 jam.

4.6 Perhatikan adanya koloni Salmonella dengan ciri-ciri berikut.

4.6.1 Brilliant green agar - tidak berwarna, merah muda, tidak jelas atau kabur dengan media sekeliling berwarna merah muda sampai merah. Beberapa salmonella kelihatan seperti koloni yang berwarna hijau bening apabila dikelilingi oleh organisma yang memfermentasi laktosa atau sukrosa, karena mikroorganisma itu memproduksi koloni dan zone yang berwarna hijau kekuningan atau hijau. Kurang dari 1% jenis Salmonella adalah tidak spesifik di mana is dapat memfermentasi laktosa dan kelihatan seperti koloni berwarna hijau kekuningan atau hijau.
4.6.2 Salmonella - Shigella agar - tidak berwarna merah muda yang pucat, bening, kabur; beberapa jenis memproduksi koloni dengan titik hitam pada bagian tengah sel.
4.6.3 Bismuth sulfite agar - coklat, hitam kadang-kadang memberi cahaya metalik. Sekeliling media biasanya berwarna coklat pada mulanya. Kemudian berubah menjadi hitam dengan makin lamanya masa inkubasi. Beberapa jenis menghasilkan koloni berwarna hijau dengan sedikit atau tanpa terjadinya warna gelap pada sekeliling media.

4.7 Pilih dua atau lebih sel dari koloni tersangka dari ketiga agar tersebut di atas untuk kemudian dunokulasikan pada TSI agar & LIA. Apabila pada agar-agar tersebut tidak ditemukan koloni tersangka maka agar tersebut diinkubasikan kembali selama 24 jam.

4.8 Inokulasikan TS1 agar dan LIA miring dengan masing-masing kolom yaitu dengan Cara membuat goresan dan menusuk agar. Setelah menginokulasi TSI agar tanpa mengambil koloni barn, gunakan jarum yang sama untuk menginokulasikan LIA.

4.9 Simpan koloni tersebut dalam ruangan dengan suhu 5—8°C atau 25°C.

4.10 Inkubasikan TSI agar miring pada suhu 35°C selama 24 ± 2 jam dengan membiarkan tutup tabung tertutup kendur dengan maksud memberikan suasana aerobik dan mencegah terbentuknya H_2 S berlehihan. Koloni yang positif akan memberikan alkalin (merah) pada agar miring dan asam (kuning) pada tusukan dengan atau tanpa terbentuknya H_2S (pembentukan warna hitam pada agar). Jangan memhuang koloni tanpa H_2 S pada agar miring.

4.11 Inkuhasi I.AA miring pada suhu 35°C selama 24 ± 2 jam dengan tutup tabung tertutup ke adur (juga dengan maksud yang sama). Koloni yang positif akan memberikan reaksi alkalin (warna ungu) pada seluruh media. Jika H_2 S terbentuk maka bagian tusukan akan berwarna kehitaman.

4.12 Apabila reaksi spesifik tidak diperlukan,, ambil koloni lainnya dari BGA, SS agar dan BSA untuk diinokulasi kembali pada TSI agar dan LIA miring.

4.13 Semua koloni positif dari TSI agar dan LIA (seperti disebutkan pada butir 4.10 dan 4.11 di atas) disimpan untuk dilakukan pengujian biokimia. Koloni yang kelihatannya negatif (termasuk agar miring yang menjadi kuning) dari TSI agar jangan dibuang, apabila koloni

tersebut memberikan reaksi spesifik pada LIA. Koloni ini harus diperlakukan seolah-olah positif dan harus dilakukan pengujian biokimia. LIA berguna untuk menentukan jenis Salmonella yang dapat memfermentasi laktosa atau sukrosa dan jenis arizona yang dapat memfermentasi laktosa.

4.14 Lakukan pengujian biokimia dan serologi kepada :
1). Tiga koloni positif dari TSI agar yang berasal dari SCB.
2). Tiga koloni positif dari TSI agar yang berasal dari tetrathyonate broth.
3). Minimal 6 koloni dari TSI agar harus diuji.
4). Jika perlu 6 koloni positif dapat dipilih dari satu set agar selektif.

5 Pengujian biokimia

5.1 Pindahkan 2 jarum inokulasi berdiameter 3 mm penuh dari TSI agar miring yang berisi koloni tersangka ke dalam tabung-tabung Rapid Urea broth, dan inkubasi selama 2 jam pada suhu 37°C dalam •water bath. Juga dari agar miring tersebut pindahkan ke dalam LIA miring, Tryptophan broth (TB) dan Dulcitol broth (DB) inkubasi semua tabung-tabung tersebut pada suhu 35°C, periksa TB untuk Indol pada 24 jam kemudian, periksa DB pada 48 jam kemudian dan LIA pada 24 jam dan 48 jam kemudian.

5.2 Simpan semua koloni yang menunjukkan basil negatif pada reaksi urea (tidak ada perubahan warna). Salmonella harus memberikan reaksi negatif pada urea.

5.3 Pindahkan koloni tersangka dari TSI agar miring yang memberikan basil negatif pada urea sebanyak 1 jarum inokulasi berdiameter 3 mm ke dalam BHI broth, dan inkuhasi pada suhu 35°C selama 4 - 6 jam sampai terjadi pertumbuhan.

5.4 LIA miring positif akan memberikan reaksi alkalin dengan terjadinya warna ungu pada seluruh medium (berwarna kuning) dan terhentuk gas.

5.5 Tes indol

1). Pindahkan 5 mm TB ke dalam tabung reaksi kosong.
2). Tambahkan 0,2 - 0,3 ml kovac's reagen.
3). Tes adalah positif apabila terjadi warna merah tua. Salmonella hams memberikan reaksi indol negatif.

6 Pengujian serologi

6.1 Serologi H - tambahkan 2,5 ml formalize saline ke dalam 5 ml kultur BHI. Masukkan 0,5 ml Polyvalent H antiserum ke dalam tabung herukuran 10 x 75 mm dan tambahkan lagi 0,5 ml kultur formalize BM. Siapkan juga saline untuk kontrol seperti di atas. Inkubasi pada suhu 50°C dan amati setiap 15 me-nit; hasilnya dihaca setelah 1 jam.

6.1.1 Positif - terjadi penggumpalan di tabung reaksi dan tidak terjadi penggumpalan pada kontrol.
6.1.2 Negatif - tidak terjadi penggumpalan pada tabung reaksi dan juga pada kontrol.

6.2 Serologi 0 - dapat dilakukan pada koloni yang berasal dari TSI agar dan LIA miring. Letakkan koloni pada gelas preparat sebanyak 1 jarum inokulasi berdiameter 3 mm. Larutkan dengan 1 tetes larutan garam (NaCl) steril. Tambahkan 1 tetes Salmonella polyvalent somatic (0) antiserum. Campur antiserum dan kultur tersebut dengan jarum yang bersih. Miringkan campuran tersebut ke depan dan ke belakang selama 1 menit dan periksa dengan menggunakan latar belakang yang gelap serta cukup penerangan. Juga lakukan pengujian kontrol dengan menggunakan larutan NaOH steril dan antiserum.

6.2.1 Positif - terjadi penggumpalan pada larutan campuran dan tidak terjadi penggumpalan pada kontrol.
6.2.2 Negatif - tidak terjadi penggumpalan baik pada larutan campuran maupun pada kontrol.

Tabel I.
Karakteristik *Salmonella*, Arizona dan Non-*Salmonella*.

Pengujian atau Substrat	*Salmonella*		Arizona	Non-Salmonella[a]
	A	B	C	
1. Urease	—	—	—	+ atau —
2. Lysine decarboxylase[b]	+ (akl)	+ (akl)	+ (akl)	— (acid)
3. Phenol red dulcitol broth	AG	AG atau A atau—	—	—
4. KCN broth	—	—	—	+
5. Malonate broth	—	—	+	+ atau —
6. Indole test	—	—	—	— atau +
7. Polyvalent flagellar test	+[c]	+[c]	+[c]	—
8. Polyvalent somatic test	+[c]	+[c]	+[c]	—
9. Phenol red lactose broth	—[d]	—[d]	AG atau A atau —	AG
10. Phenol red sucrose broth	—[d]	—[d]	—	AG
11. Voges—Proskauer test	—	—	—	+ atau —
12. Methyl red test	+	+	+	—
13. Simmons citrate	+	+ atau —	+	+ atau —

a. Reaksi selain non-Salmonella terjadi.
b. Salmonella paratyphi A berkarakteristik negatif pada lysine decarboxylase.
c. Reaksi negatif terjadi pada aglutinin tidak terdapat pada antisera.
d. Mayoritas dari strain memberikan basil negatif, tetapi atypical strain memberikan hasil positif.

Lampiran 1: Media Pembiakan

Beberapa dari formulasi media tercantum dalam lampiran ini tersedia secara komersial baik dalam bentuk dehidrasi atau yang langsung dapat digunakan. Kecuali adanya ketentuan-ketentuan yang diperlukan, formulasi komersil tersebut telah dibuktikan baik untuk digunakan pada metode pengujian yang tercantum di atas. Akan tetapi instruksi untuk penyiapan media harus benar-benar ditaati.

Beberapa formulasi komersial berbeda dengan formulasi aslinya, sebab (1) adanya beberapa modifikasi yang telah dikembangkan atau (2) pembuatan media telah menemukan bahwa beberapa perbedaan konsentrasi dan jenis bahan, kontrol pH yang lebih baik, produktifitas, hambatan dan sebagainya dapat dipertahankan. Perubahan-perubahan ini biasanya mendorong kegunaan dari media untuk tujuan-tujuan tertentu. Perubahan-perubahan formula telah dibuktikan tidak berpengaruh terhadap pertumbuhan mikrorganisma jika dibandingkan dengan formula aslinya. Selain itu, pengawasan terhadap kualitas dari media komersial memerlukan pengujian-pengujian untuk produktifitas, hambatan dan sebagainya untuk tiap lot media dengan pengujian kontrol mikroorganisma terpilih secara hati-hati. Oleh sebab itu kualitas dari media dehidrasi pada umumnya mempunyai tingkat yang lebih baik dibandingkan dengan media yang dibuat di laboratorium.

Merupakan suatu hal yang harus dilakukan untuk menginokulasi 1 set mikroorganisma kontrol pada setiap lot media. Pelaksanaan ini sangat disarankan terutama pada laboratorium yang berhubungan dengan riset dan pengembangan metoda analisa yang tergantung pada karakteristik biokimia spesifik dari mikroorganisma.

1 Bismuth sulfite agar (Wilson and Blair)

Polypeptone (atau peptone)	10 g
Beef extract	5 g
Glucose (dextrose)	5 g
Disodium phosphate (kering)	4 g
Ferrous sulfate (kering)	0,3 g
Bismuth sulfite, $Bi_3(SO_3)_3$ (indikator)	8 g
Brilliant green	0,025 g
Agar	20g
Aquadest	1 liter

Aduk hingga homogen dan panaskan sambil diaduk. Didihkan selama 1 menit untuk mendapatkan suspensi yang homogen (residu tidak dapat dilarutkan). Dinginkan sampai suhu 45-50°C. Larutkan residu dengan mengaduk secara perlahan-lahan dan tuangkan 20 ml ke dalam petridish berukuran 15 x 100 mm. Biarkan hingga kering selama 2 jam dengan

sehagian tutup terbuka, kemudian tutup. pH akhir 7,6 ± 0,2. Jangan di autoclave.

2 Brain hearth infusion broth (Bhi)

Calf brain infusion	200 g
Beef hearth infusion	250 g
Proteose peptone atau geiysate	10 g
Sodium chlorida	5 g
Disodium phosphate (tidak mengandung air)	2,5 g
Dextrose	2 g

Larutkan bahan dalam 1 liter aquadest. Panaskan perlahan-lahan jika perlu. Masukkan ke dalam botol tabung untuk disimpan, dan autoclave selama 15 menit pada suhu 121°C.

3 Brilliant green agar

Proteose peptone = atau polypeptone	10 g
Yeast extract	3 g
Sodium cloride	5 g
Lactose	10 g
Sucrose	10'g
Phenol red	0,08 g
Brilliant green (5 ml dari larutan 0,25%)	0,0125 g
Agar	20g

Larutkan medium dalam 1 liter air, aduk hingga merata dan panaskan dengan se-ring mengaduk. Didihkan selama 1 menit untuk melarutkan. Autoclave 1 liter bagian selama 12 menit pada suhu 121°C. (Penambahan panas mengurangi selektifitas medium, sedangkan pemanasan yang kurang akan menambah selektifitas). Dinginkan pada 45—50°C, dan tuangkan 20 ml bagian itu ke dalam petridish yang berukuran 15 x 100 mm. Biarkan hingga kering sekitar ± 2 jam dengan tutup sedikit terbuka; kemudian tutup. pH akhir 6,9 ± 0,2.

4 Glucose broth (MR — VP Broth) — Buffered

Proteose peptone	7 g
Glucose	5 g
Dipotassium phosphate (K $11PG_4$)	5 g
Aquadest	1 liter

Apabila digunakan untuk kultur V. parahaemoly ticus gunakan 30 g NaCl per liter. Larutkan peptone, glucose dan potassium phosphate dalam 800 ml air dengan pemanasan yang sedang; saring, dinginkan hingga 20°C, encerkan hingga 1 liter. Pindahkan tiap 10 ml dalam tabung reaksi, dan autoclave selama 12-15 menit pada suhu 121°C. Maksimum pemanasan harus < 30 menit. pH akhir 6,9 ± 0,2.

5 Glucose salt teepol broth (Gstb)

	Single strength	Double strength
Beef extract	3 g	3 g
Peptone	10 g	20 g
Sodium chloride	30 g	60 g
Glucose	5 g	10 g
Methyl violet	0,002 g	0,004 g
Teepol	4 ml	8 ml
Aquadest	1 liter	1 liter

Bagian single-strength (berkekuatan tunggal) dengan porsi 10 ml. Bagikan double-strength (berkekuatan ganda) broth dalam porsi 10 ml dan masukkan dalam tabung yang cukup besar untuk menampung 10 ml contoh. Apabila contoh yang akan diperiksa dalam jumlah yang besar (25 g) gunakan wadah bertutup dengan kapasitas 225 ml single-strength broth. Sterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit. pH akhir 7,4.

6 Lactose broth

Beef extract	3 g
Peptone	5 g
Lactose	5 g
Aquadest	1 liter

Larutkan semua bahan dalam aquadest dengan pemanasan 65°C, dan pindahkan dalam tabung fermentasi. Autoclave selama 15 menit pada suhu 121°C. pH akhir harus 6,9 ± 0,2,

7 Lauryl sulfate tryptose (Lst) broth

Tryptose atau trypticase (Encim pankreas untuk casein)	20 g
Lactose	5 g
Dipotassium phosphate (K_2 HPO_4)	2,75 g
Monopotassium phosphate (KH_2 PO_4)	2,75 g
Sodium chloride	5 g
Sodium lauryl sulfate	0,1 g
Aquadest	1 liter

Larutkan semua bahan dan bagikan tiap 10 ml dalam 20 x 150 mm tabung reaksi yang berisi tabung fermentasi 10 x 75 mm terbalik. Larutan harus menutupi bagian fermentasi setelah sterilisasi. Autoclave 15 menit pada suhu 121°C. pH akhir 6,8 ± 0,2.

8 Lysine decarboxylase broth (Falkow)

Gelysate atau peptone	5 g
Yeast extract	3 g
Glucose	1 g

L-lysine	5 g
Bromcresol purple	0,02 g
Aquadest	1 liter

Panaskan hingga larut. Pindahkan tiap-tiap 5 ml ke dalam 16 x 125 mm tabung reaksi bertutup. Kendurkan tutup dan autoclave pada suhu 121°C, 15 menit. Tutup tabung kembali dengan kencang untuk disimpan setelah inokulasi. pH akhir 6,5 — 6,8.

9 Lysine iron agar (Edwards And Fife)

Gelysate atau peptone	5 g
Yeast extract	3 g
Glucose	1 g
L-lysine	10 g
Ferric ammonium citrate	0,5 g
Sodium thiosulfate anhydrous ($Na_2 S_2 0_3$)	0,04 g
Bromcresol purple	0,02 g
Agar	15g
Aquadest	1 liter

Panaskan hingga terlarut. Pindahkan tiap-tiap 4 ml ke dalam tabung reaksi 12 x 100 mm, dan tutup sedemikian rupa sehingga kondisi anaerob di dalamnya dapat dipertahankan selama pemakaian. Autoclave 121°C, 12 menit. Sebelum dibekukan, miringkan posisi tabung sehingga diperoleh 1-1/2 inchi agar tusukkan dan 1 inchi agar miring. pH akhir 7,6 ± 0,1.

10 Malonate broth

Yeast extract	1 g
Ammonium sulfate, $(NH_4)_2 SO_4$	2 g
Monopotassium phosphate ($KH_2 HPO_4$)	0,6 g
Potassium phosphate (KN, HPO_4)	04 g
Sodium chloride	2 g
Sodium malonate	3 g
Glucose	0,25 g
Bromytmol blue	0,025 g
Aquadest	1 liter

Larutkan dan panaskan jika perlu. Pindahkan tiap 3 ml ke dalam tabung reaksi 13 x 100 mm, dan autoclave 15 menit dengan suhu 121°C. pH akhir 6,7 ± 0,2.

11 MC. Conkey agar

Proteose peptone atau polypeptone	3 g
Peptone atau gelysate	17 g
Lactose	10 g
Bile Salts 3 (atau campuran bile salts)	1,5 g

Sodium chloride	5 g
Neutral red	0,03 g
Crystal violet	0,001 g
Agar	13,5g
Aquadest	1 liter

Larutkan hingga honiogen. Panaskan dengan pengadukan yang teratur (kadangkadang saja), dan didihkan 1-2 menit sampai larutan merata. Autoclave 121°C, 15 menit, dinginkan sampai 45-50°C dan tuang tiap porsi 20 ml ke dalam petridish 15 x 100 mm. Biarkan dingin dengan petri tertutup selama . 2 jam. Jangan gunakan petri yang basah. pH akhir 7,1 ± 0,2.

12 Motility - Nitrate medium - Buffered (Untuk C. Perfringens).

Beef extract	3 g
Peptone (difco)	5 g
Potassium nitrate (KNO_3)	5 g
Disodium hydrogen phosphate (Na, HPO_4)	2,5 g
Agar	3g
Galactose	5 g
Glycerin (reagent grade)	5 ml
Aquadest	1 liter

Larutkan semua bahan, kecuali agar, sesuaikan hingga pH 7,3 ± 0,1, tamoahkan agar, dan panaskan hingga larut. Campur hingga merata, pindahkan tiap-tiap 11 ml ke dalam tabung reaksi 16 x 150 mm, dan autoclave 121°C, selama 10 menit.

13 Nutrient broth

Beef extract	3 g
Peptone	5 g
Aquadest	1 liter

Panaskan hingga larut, dan pindahkan tiap-tiap 10 ml ke dalam tabung reaksi atau 225 ml ke dalam labu, dan autoclave 121°C selama 15 menit. pH akhir 6,8 ± 0,2.

14 Phenol red carbohydrate broth

Trypticase atau proteose peptone ≠ 3	10 g
Sodium chloride	5 g
Beef extract (jika diinginkan)	1 g
Phenol red (atau 7,2 ml larutan phenol red 0,25%)	0,018 g
Aquadest	1 liter

Larutkan 5 g dulcitol, 10 g lactose atau 10 g sucrose (seperti pada pengujian Salmonella) dalam basal broth ini. Pindahkan tiap 2,5 ml ke dalam tabung reaksi 13 x 100 mm yang berisi 6 x 50 mm tabung fermentasi terbalik. Autoclave 118°C, 10 menit, pH akhir 7,3 ± 0,2.

Cara lain, larutkan bahan, pisahkan karbohidrat, dalam 800 ml air dan panaskan dengan pengadukan: pindahkan tiap-tiap 2 ml ke dalam tabung reaksi 13 x 100 mm yang berisi tabung fermentasi terbalik. Autoclave 118°C, 15 menit, dan biarkan hingga dingin. Larutkan karbohidrat dalam 200 ml air, dan sterilisasi dengan menyaring larutan dengan filter penahan bakteri. Secara aseptis tambahkan 0,5 ml filtrat steril ke dalam tiap tabung broth steril setelah pendinginan sampai 45°C. Kocok perlahan-lahan. pH akhir 7,4 ± 0,2.

15 Purple carbohydrate broth

Siapkan seperti phenol carbohydrate broth, dengan menggunakan broth : 10 g proteose peptone; 3,1 g beef extract;: 5 g sodium chloride;,dan 0,015 giatau 0,020 g bromcresol purple dan 1 liter aquadest. pH akhir 6,8 ± 0,2.
Formula di atas digunakan untuk menentukan Salmonella. Formula yang sama digunakan untuk penentuan Shigella dan V. Cholerae, kecuali bromcresol purple dinaikkan hingga 0,04 g, liter dan pH disesuaikan sampai 7,0.
Untuk V. parahaemolyticus, disarankan 0,04 g bromcresol puple/liter ditambah 25 g NaCl liter. Medium harus disesuaikan pHnya hingga 7,0.

16 Potassium cyanide broth (Kcn)

Proteose peptone ≠ 3 atau polypeptone	3 g
Sodium chloride	5 g
Monopatassium phosphate (KH_2PO_4)	0,225 g
Disodium phosphate (Na_2HPO_4)	5,64 g
Aquadest	1 liter

Larutkan bahan dengan autoclave selama 15 menit dengan suhu 121°C. Dinginkan dan masukkan ke refrigerator pada suhu 5-8°C. pH akhir 7,6 ± 0,2. Larutkan 0,5 g KCN dalam 100 ml aquadest dingin steril (5-8°C). Dengan menggunakan pipet penghisap (jangan menggunakan mulut), secara aseptis tambahkan 15 ml larutan KCN dingin/liter basal broth dingin steril (atau 1,5 ml KCN ke 100 ml broth). Aduk perlahan-lahan hingga homogen, dan secara aseptis pindahkan tiaptiap 1-1,5 ml ke dalam 13 x 100 ml tabung reaksi. Dengan menggunakan teknik-teknik aseptis, segera tutup dengan gabus No. 2 tang dibalut dengan paraffin. Siapkan gabus dengan mendidihkan dalam parafin selama 15 menit letakkan gabus pada tabung sehingga parafin tidak mengalir ke dalam broth, tetapi membentuk penyekat yang baik antara bibir tabung gabus. Simpan media pada suhu 5-8°C yang biasanya dapat tahan selama 2 minggu.

17 Salmonella-Shigella agar (SS Agar)

Beef extract	5 g
Polypeptone atau proteose peptone	5 g
Lactose	10 g

Bile salts mixture	8,5 g
Sodium citrate	8,5 g
Sodium thiosulfate (Na_2 S_2 0_3)	1 g
Ferric citrate	13,5 g
Brilliant green (0,33 ml dari larutan 0,1%)	0,33 g
Neutral red (2,5 ml clan larutan 0,1%)	25 g
Aquadest	1 liter

Campurkan hingga homogen, Panaskan dengan pengadukan, dan didihkan se-lama 1-2 menit sampai larutan merata. Dinginkan hingga 45-50°C, dan tuang tiap-tiap 20 ml ke dalam petridish. Biarkan kering selama 2 jam dengan tutup sedikit terbuka; kemudian tutup. pH akhir 7,0 ± 0,2. Jangan autoclave.

18 Selenite cystine broth

Medium 1 :

Tryptone atau polypeptone	5 g
Lactose	4 g
Sodium selenite ($NaHSeO_3$)	4 g
Disodium hydrogen phosphate (Na_2 HPO_4)	10 g
Cystine	0,01 g
Aquadest	1 liter

Panaskan dengan pengadukan hingga merata. Pindahkan tiap-tiap 10 ml ke tabung-tabung reaksi 16 x 150 mm. Panaskan 10 menit dengan pengukusan. Jangan autoclave. pH akhir 7,0 ± 0,1. Medium tidak steril. Gunakan pada hari yang sama saat dilakuan persiapan.

19 Simmon's citrate agar

Sodium citrate	2 g
Sodium chloride	5 g
Dipotassium phosphate (K, HPO_4)	1 g
Ammonium phosphate (NH_4 H_2 PO_4)	1 g
Magnesium sulfate $MgSO_4$)	0,2 g
Bromthymol blue	0,08 g
Agar	15 g

Panaskan perlahan-lahan dan gunakan pengadukan. Didihkan 1—2 menit sampai larutan merata. Isi tabung-tabung reaksi 13 atau 16 x 150 mm, 1/3 bagian dan tutup hingga kondisi aerobik dapat dipertahankan selama dipakai.

20 Selenite cystine broth

Medium 2 :

North-Bartram modification, Appl. Microbio. 1:130 (1935)

Polypeptone atau Tryptone	5 g

	(atau 4 g
Lactose	4 g
Sodium selenite ($NaHSeO_3$)	4 g
Disodium hydrogen phosphate (Na_2 HPO_4)	5,5 g
KH_2 PO_4	4,5 g
L—Cystine	0,01 g
Aquadest	1000 ml

21 Tetrathyonate broth dengan Iodine dan brilliant green

Polypeptone	5 g
Bile salts	1 g
Calcium carbonate ($CaCO_3$)	10 g
Sodium thiosulfate (Na_2 S_2 $0_3.5H_2$ 0)	30 g
Aquadest	1 liter

Campur hingga homogen, dan didihkan; dinginkan sampai 45°C dan simpan pada suhu 5 - 8°C.
Larutan Iodine - Potassium (I - KI).
Larutkan 5 g KI dalam 5 liter aquadest steril; tambahkan 6 g resublim I_2 ; Larutkan, dan encerkan sampai 20 ml dengan aquadest steril.

Larutan Brilliant green.
Larutkan 0,1 g brilliant green dalam aquadest steril dan encerkan hingga 100 ml. Pada hari media akan digunakan, tambahkan larutan 20 ml KI dan 10 ml larutan brilliant green per liter basal broth. Larutkan endapan penguapan dengan mengaduk perlahan-lahan, dan secara aseptis pindahkan tiap-tiap,10 ml ke dalam 20 x 150 mm tabung-tabung reaksi steril.
Jangan memanaskan medium setelah penambahan KI dan larutan warna. Basal medium dapat disiapkan dengan atau tanpa brilliant green, dan bagikan pada tiap-tiap bagian 10 ml, sterilisasi pada syhu 121°C, dan simpan sampai saat akan digunakan (apabila brilliant green belum ditambahkan) dan larutan KI ditambahkan dalam jumlah yang sesuai.

22 Trypticase soy broth

Trypticase peptone	17,0 g
Phytone peptone	3,0 g
Sodium chloride	5,0 g
Dipotassium phosphate	2,5 g
Dextrose	2,5 g
Aquadest	1000 ml

Larutkan bahan sampai mendidih 1—2 menit. Pindahkan ke dalam wadah yang cocok. Sterilisasi 121°C, 15 menit. pH akhir 7,3 ± 0,2. Apabila medium ini digunakan untuk V. parahaemolyticus tambahkan 25 g NaCl lagi untuk memperoleh kadar NaCl 3%.

23 Triple sugar iron agar (Tsi Agar)

Medium 1

Polypeptone	20 g
Sodium chloride	5 g
Lactose	10 g
Sucrose	10 g
Glucose	1 g
$Fe (NH_4)_2 (SO_4)_2 .6H_2 O$	0,2 g
$Na_2 S_2O_3$	0 ,2 g
Phenol red	0,025 g
Agar	13g

Medium 2

Beef extract	3 g
Yeast extract	3 g
Peptone	15 g
Proteose peptone	5 g
Glucose	1 g
Lactose	10 g
Sucrose	10g
$FeSO_4$	0,2 g
Sodium chloride	5 g
$Na_2 S_2O_3$	0,3 g
Phenol red	0,024 g
Agar	12g

Kedua media dapat saling menggantikan untuk kegunaan umum. Apabila digunakan untuk V. parahaemolyticus tambahkan 25 g NaCl/liter pada salah satu formula.

Larutkan bahan (1 atau 2) dalam 1 liter aquadest, campur hingga homogen, dan panaskan dengan pengadukan. Didihkan 1 menit hingga merata. Isi tabung 16 x 150 mm 1/3 nya, dan tutup hingga kondisi anaerob dapat dipertahankan selama penggunaan. Autoclave Medium 1 118°C, 15-17 menit dan Medium 2 112°C, 15 menit. Setelah medium membeku, miringkan tabung sehingga diperoleh agar tusukkan 2-3 cm dan miring (4-5 cm) hingga beku. pH 7,3 ± 0,2.

24 Trypticase soy - Tryptose broth

Trypticase Soy Broth (dehidrasi komersial)	15 g
Tryptose Broth (dehidrasi komersial)	13,5 g
Yeast extract	3,0 g
Aquadest	1000 ml

Formula untuk Trypticase Soy Broth

Trypticase peptone	17,0 g
Phytone peptone	3,0 g
Sodium chloride	5,0 g
Dipotassium hydrogen phosphate	2,5 g
Dextrose	2,5 g
Aquadest	1000 ml

Formula untuk Tryptose Broth

Bacto-tryptose	20,0 g
Sodium chloride	. 5,0 g
Bacto-dextrose	1,0 g
Aquadest	1000 ml

Kombinasi 15 g trypticase soy broth dehidrasi komersial 13,5 g, tryptose broth dehidrasi komersial, dan 3 g yeast extract. Larutkan dalam 1 liter aquadest. Panaskan dam aduk hingga merata. Panaskan perlahan-lahan jika perlu. Autoclave 121°C, 15 menit, pH akhir 7,2 ± 0,2.
Analis harus mempunyai alasan dalam menggunakan satu formula atau kombinasi keduanya dengan penambahan 0,3% yeast extract. Salah satu dari kedua media tersebut memuaskan untuk kultur Salmonella dalam pengujian serologi flagellar. Akan tetapi, kombinasi kedua media lebih disarankan.

25 Tryptone broth

Tryptone atau trypticase	10 g
Aquadest	1 liter

Apabila digunakan untuk V. parahaemolyticus, tambahkan 30 g NaCl/liter. Larutkan, dan pindahkan tiap-tiap 5 ml ke dalam tabung reaksi dan autoclave 121°C, 15 menit.

26 Urea broth

Urea	20 g
Yeast extract	0,1 g
Potassium phosphate (KH_2 PO_4)	9,1 g
Disodium phosphate (Na_2 NPO_4)	9,5 g
Phenol red	0,01 g
Aquadest	1 liter

Larutkan bahan dalam aquadest. Jangan dipanaskan. Sterilisasi dengan filter. Secara aseptis, pindahkan tiap 1,5-3 ml ke dalam tabung reaksi 13 x 100 mm steril. pH akhir 6,8 ± 0,2.

27 Urea broth - Rapid

Urea	20 g
Yeast extract	0,1 g
Monopotassium hydrogen phosphate (KH_2PO_4)	0,091 g
Disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4)	0,095 g
Phenol red	0,01 g
Aquadest	1 liter

Larutkan bahan dalam aquadest. Jangan dipanaskan. Sterilisasi dengan filter, dan secara aseptis pindahkan 1,3-3 ml ke dalam tabung reaksi 13 x 100 mm steril. pH akhir 6,8 ± 0,1.

Lampiran 2: Larutan formalinized physiological saline

1 Untuk salmonella

Formaldehyde (36—38%)	6 ml
Sodium chloride	8,5 g
Aquadest	1 liter

Larutkan 8,5 g NaCl dalam 1 liter aquadest. Autoclave 15 menit pada suhu 121°C dan dinginkan sampai suhu ruang. Tambahkan 6 ml larutan HCHO (36-38%). Jangan di autoclave setelah penambahan formaldehyde.

2 Untuk enteropatogenik E. coli

Sodium chloride	5 g
Formaldehyde (36¯38%)	5 ml
Aquadest	1 liter

Larutkan 5 g NaCl dalam 1 liter aquadest. Sterilisasi pada suhu 121°C, selama 15 menit dan dinginkan sampai suhu ruang. Tambahkan 5 ml formaldehide (36—38%). Simpan dalam botol gelas tertutup di tempat gelap pada suhu ruang atau refrigerator.

Kadar gararn yang lebih rendah cocok untuk E. coli I. Akan tetapi, formalized 0,85% saline digunakan juga untuk serologi flagellar E. coli.

3 1 N Hydrochloric acid

Hydrochloric acid (pekat)	89 ml

Encerkan menjadi 1 liter dengan aquadest.

4 Reagensia Kovac's

p¯Dimethylaminobenzaldehyde	5 g
Amyl alcohol atau isoamyl alcohol	75 ml
Hydrochloric acid (pekat)	25 ml

Larutkan ip—Dimethylaminobenzaldehyde dalam amyl alcohol atau Isoamyl alcohol, dan kemudian perlahan-lahan tambahkan hydrocloric acid. Simpan dalam suhu 4°C. Untuk pengujian Indole, tambahkan 0,2—0,3 ml reagensia ke 5 ml kultur bakteri pada tryptone broth yang telah diinkubasi 24 jam. Warna merah pada lapisan atas menunjukkan hasil positif. Untuk enteropatogenik E. coli, juga diuji setelah 72 jam apabila pada 24 jam memberikan hasil negatif.

5 Indikator methyl red

Methyl red	0,01 g
Alcohol (ethyl) 95%	300 ml
Aquadest, cukup untuk membuat	500 ml

Larutkan methyl red dalam 300 ml alkohol, dan buat hingga 500 ml dengan aquadest.

6 Larutan Potassium Hydroxide

KOH	40 ml
Aquadest	1000 ml

7 Larutan Physiological Salt (Sterile)

Sodium chloride	8,5 mg
Aquadest	1 liter

Larutkan 8,5 g NaCl dalam 1 liter aquadest. Autoclave 121°C, 15 menit dan dinginkan sampai suhu ruang.

8 Larutan Sodium Hydroxide (Sekitar 1 N)

Sodium hydroxide	40 mg
Aquadest	1000 ml

Digunakan untuk penyesuaian pH media kultur.

9 Tercitol Anionic 7

Reagensia ini adalah turunan sodium sulfate dari 3,9-diethyl tricecanol-6. Disarankan untuk membasahi dan membuat emulsi di mana elektrolit berada di bawah 1% tekstil, emulsi polimer, karet, kulit dan formasetikal.

10 Triton X -100

Reagen ini adalah nama dagang dari octylphenoxy polyetoxy ethanol. Disarankan untuk digunakan sebagai zat pembasah, detergen, pemisah dan pengemulsi di rumah tangga dan pembersih industri, proses tekstil, penggosok wool, zat pengemulsi untuk insektisida dan herbisida.

11 Reagensia Tes Voges - Proskauer (Vp)

Larutan 1

α-Napthol	5 g
Alcohol (absolut)	100 ml

Larutan 2

Potassium hydroxide	40 g

Lakukan VP test pada suhu ruang dengan memindahkan 1 ml kultur yang herumur 48 jam ke dalam tahung realcsi dan tambahkan 0,6 ml a—Napthol(larutan 1) dan 0,2 ml KOH 40% (lrutan 2); kocok setelah penamhahan tiap-tiap larutan. Lntuk memperoleh reaksi yang cepat dan intensif, tamhahkan heberapa kristal creatine dalam tes medium. Baca hasilnya setelah 4 jam penamhahan reagensia-reagensia. Tes VP positif terhentuk warna merah muda eosin.

12 Larutan Brilliant Green Dye 1%

Brilliant green dye	1 g
Aquadest steril	100 ml

Larutkan 1 g dye dalam air steril, dan encerkan hingga 100 ml. Karena beherapa DYE bersifat toksin, maka uji dye tersehut sehelum digunakan, dan gunakan hanya yang memherikan hasil memuaskan apahila diuji dengan mikoorganisma positif dan negatif yang telah diketahui.

13 Larutan Crystal Violet

Larutkan 10 g dye (Index warna No. 42555) dalam 100 ml alkohol dan saring.